

REMARKS

Obviousness Rejections

On page 4 of the Office Action, in paragraph 4, claims 1-7 and 9 are rejected under 35 U.S.C. 103(a) as being unpatentable over Buscemi et al. (US 5,500,013) in view of Sasajima et al. (JP 8-33661). On page 8 of the Office Action, in paragraph 5, claim 5 is rejected under 35 U.S.C. 103(a) as being unpatentable over Buscemi et al. (US 5,500,013) in view of Sasajima et al. (JP 8-33661) as applied to claim 1 above, and further in view of Stedronsky et al. (US 6,033,654). On page 12 of the Office Action, in paragraph 6, claims 8 and 10 are rejected under 35 U.S.C. 103(a) as being unpatentable over Buscemi et al. (US 5,500,013) in view of Sasajima et al. (JP 8-33661) as applied to claim 1 above and further in view of Miyamoto (US 2004/0136977).

Applicants respectfully submit that the present invention is not obvious over the cited art, and request that the Examiner reconsider and withdraw this rejection in view of the following remarks.

1. Crosslinking and activity of drug

Applicants note that the Examiner indicates that the applicant has provided no evidence to support the argument that the crosslinking would spoil the drug of Buscemi (lines 1-3 of the first full paragraph on page 3 of the Final Office Action).

In response, Applicants submit herewith "OUTLINE OF ENZYME ENGINEERING". This document suggests that the crosslinking of an enzyme (protein) would spoil the activity of the protein. Please see Table 4.2 of the document (an English translation is appended). Table 4.2 shows that the possibility of deactivation of an enzyme is large in a crosslinking method.

Thus, a person skilled in the art would avoid crosslinking of drug (elastin) to maintain the activity thereof.

2. The purpose of using (crosslinked) elastin

Buscemi uses elastin as a bioactive material (drug).

Sasajima's artificial blood tube has a crosslinked elastin on the support which does not decompose in a living body. The crosslinked elastin is used to prevent adhesion of blood cells (paragraph [0001]).

In contrast to Buscemi and Sasajima, the crosslinked elastin is used to increase tear strength and flexibility, which allow the tube or artificial blood vessel to endure sutures at the time of operation in the present invention (page 3, line 9-15 of the present application).

In this regard, Applicants submit that both Buscemi and Sasajima are not considering tear strength and flexibility at the time of operation.

Thus, Applicants submit that one would not have arrived at the present invention from Buscemi and Sasajima. Further, it is submitted that the other references do not make up for the deficiencies of Buscemi and Sasajima.

Accordingly, reconsideration and withdrawal of the obviousness rejections is respectfully requested.

Conclusion

In view of the above, reconsideration and allowance of this application are now believed to be in order, and such actions are hereby solicited. If any points remain in issue which the Examiner feels may be best resolved through a personal or telephone interview, the Examiner is kindly requested to contact the undersigned at the telephone number listed below.

The USPTO is directed and authorized to charge all required fees, except for the Issue Fee and the Publication Fee, to Deposit Account No. 19-4880. Please also credit any overpayments to said Deposit Account.

Respectfully submitted,



Bruce E. Kramer
Registration No. 33,725

SUGHRUE MION, PLLC
Telephone: (202) 293-7060
Facsimile: (202) 293-7860

WASHINGTON OFFICE

23373

CUSTOMER NUMBER

Date: October 13, 2009

Biotechnology Textbook Series 8**OUTLINE OF ENZYME ENGINEERING**

Written by Atsuo Tanaka, doctor of engineering, and Ryuichi Matsuno, doctor of engineering

Published by Corona Co., Ltd.

4. immobilization of biocatalyst

A carrier must have high mechanical strength and be stable physically, chemically and biochemically under use conditions. Particularly when an immobilized biocatalyst is used in the food industry and the medical supply industry, it must be harmless to humans.

As for the chemical structure of a carrier, the carrier must have a functional group required for the immobilization of a biocatalyst or must have a structure into which a functional group can be introduced. Since an immobilized biocatalyst is used in various forms in accordance with the design of a reactor, it must be easily processed and formed. It is also important to take its economic efficiency into consideration. Up till now, use examples of a wide variety of carrier have been reported no matter whether they are organic compounds or inorganic compounds. Typical carriers are listed in Table 4.1.

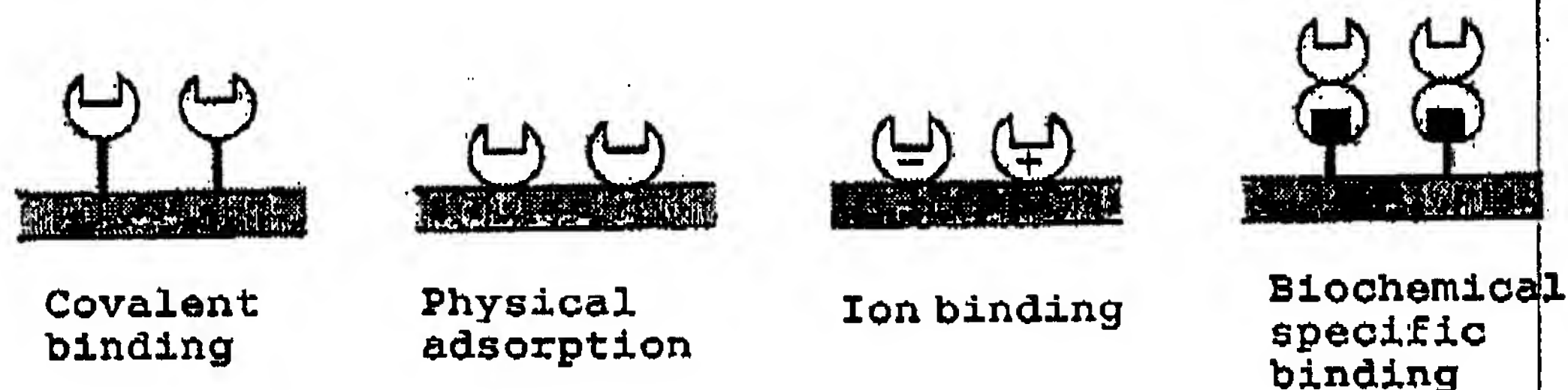
There are the following immobilizing methods:

- 1) a carrier bonding method for immobilizing a biocatalyst to a carrier by covalent binding, ion binding, physical adsorption or biochemical attraction,
- 2) a crosslinking method for insolubilizing biocatalysts by crosslinking them with a biofunctional or polyfunctional reagent such as glutaraldehyde; and
- 3) an inclusion method for wrapping a biocatalyst in a polymer gel (lattice type) produced by polymerizing or associating a low molecular weight compound or shifting a polymer compound from a soluble state to an insoluble

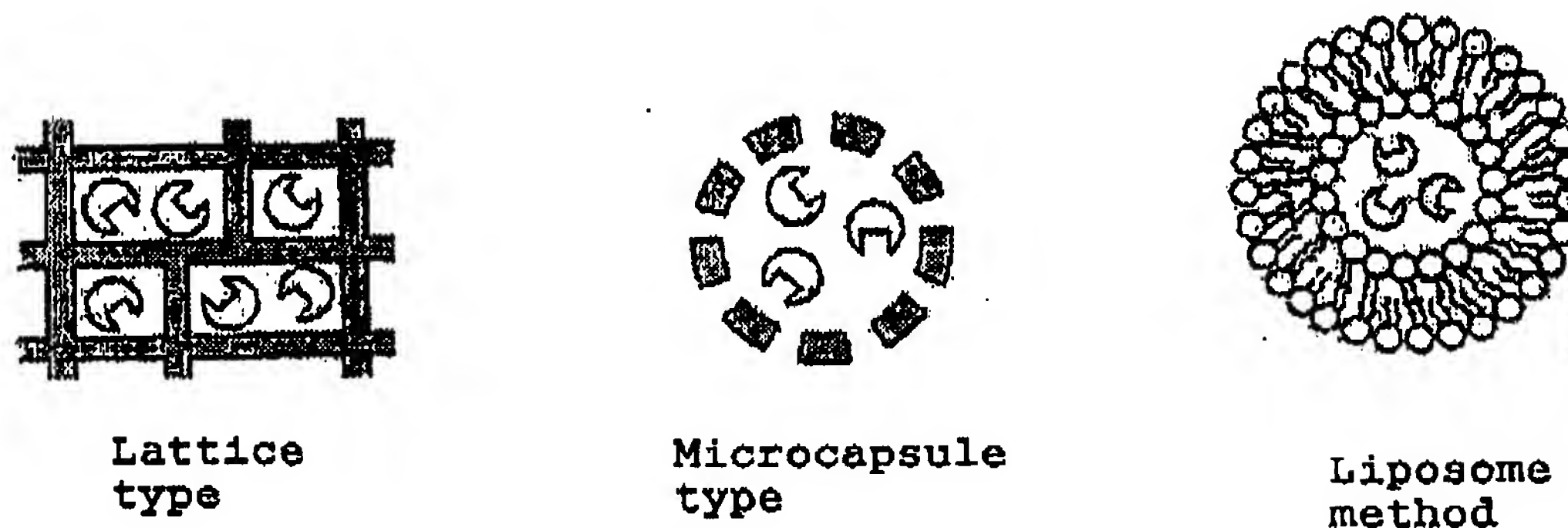
state, microcapsule, liposome or micelle, or blocking a biocatalyst in a hollow fiber or an ultrafiltration membrane (Fig. 4.1).

Since the crosslinking method 2) is not an immobilization method in a strict sense, an enzyme immobilized by any method may be called "insoluble enzyme".

Although these immobilizing methods have an advantage and a disadvantage (Table 4.2), the inclusion immobilizing method is often used in the industrial process because it has such high general applicability that it has such high general applicability that it can be used for the immobilization of all types of biocatalysts.



[Carrier binding method]



[inclusion method]

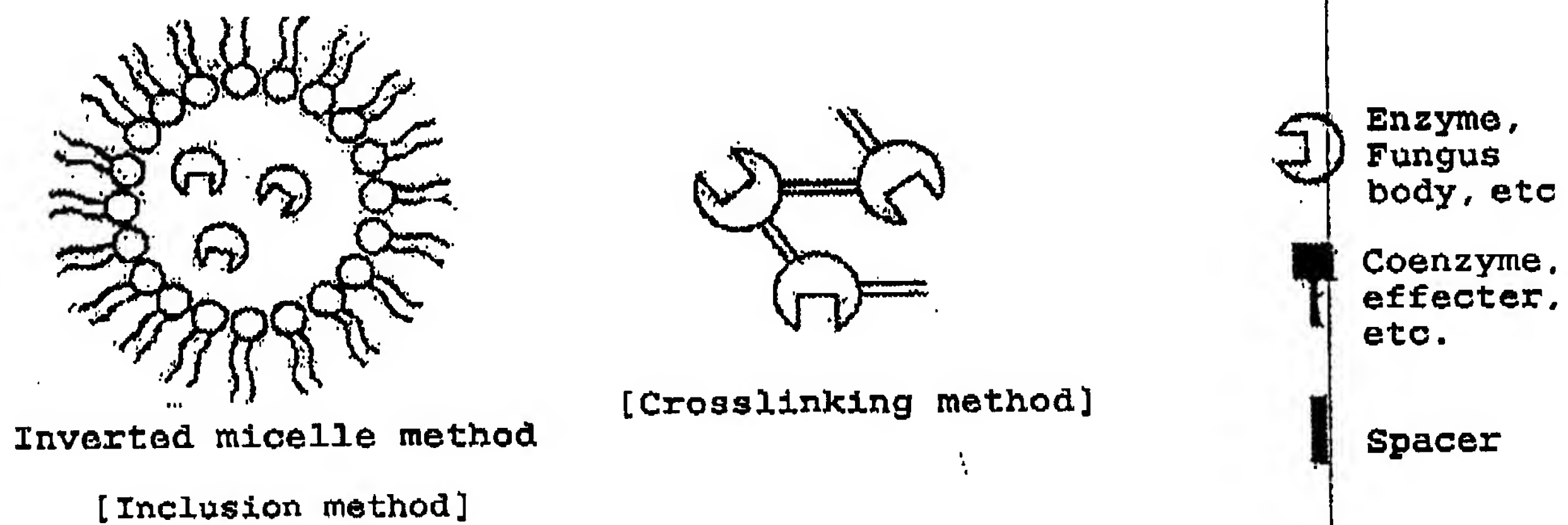


Fig. 4.1 various biocatalyst immobilizing methods

Table 4.2 advantages and disadvantages of biocatalyst immobilizing methods

Properties	Immobilizing method						
	Carrier binding method			Crosslinking method	Inclusion methods		
	Covalent binding	Physical adsorption	Ion binding		Lattice type	Microcapsule	Liposome
Preparation	Difficult	Easy	Easy	Difficult	Easy	Difficult	Difficult
Possibility of deactivation of enzyme at the time of preparation	Large	Small	Small	Large	Small	Large	Small
Binding force	Strong	Weak	Weak	Strong	Strong	Strong	Intermediate
Regeneration of carrier	Impossible*	Possible	Possible	-	Impossible	Impossible	Impossible
Range of immobilization	Narrow to medium	Intermediate	Intermediate	Intermediate	Wide	Wide	Wide
Immobilization cost	High	Low	Low	Low	Intermediate	Intermediate	Intermediate

[edited and written by Saburo Fukui: microorganism as biocatalyst, p.101, published by Kyoritsu Shuppan (1979) (Ichiro Chibata: Table 1 at page 23 of Applied Enzymology at the Lecture Meeting of Basic Enzyme Engineering (1978) was revised]

* possible in the case of disulfide binding

As shown in Table 4.1, a wide variety of substances such as natural polymers such as polysaccharides and proteins, synthetic polymers, inorganic substances such as glass, ceramics and metal oxides, and low molecular weight compounds such as lipid and surfactants are used as the carrier used in this immobilization method. The carrier used is various in shape such as a granular, block-like, film-like, sheet-like, fabric-like or fibrous shape.

Although some typical immobilization methods are introduced below, as for Examples, please refer to other documents.

OUTLINE OF ENZYME ENGINEERING

© Tanaka and Matsuno 1995

First Edition was published on October 30, 1995

Authors, ATSUKO TANAKA and RYUICHI MATSUNO

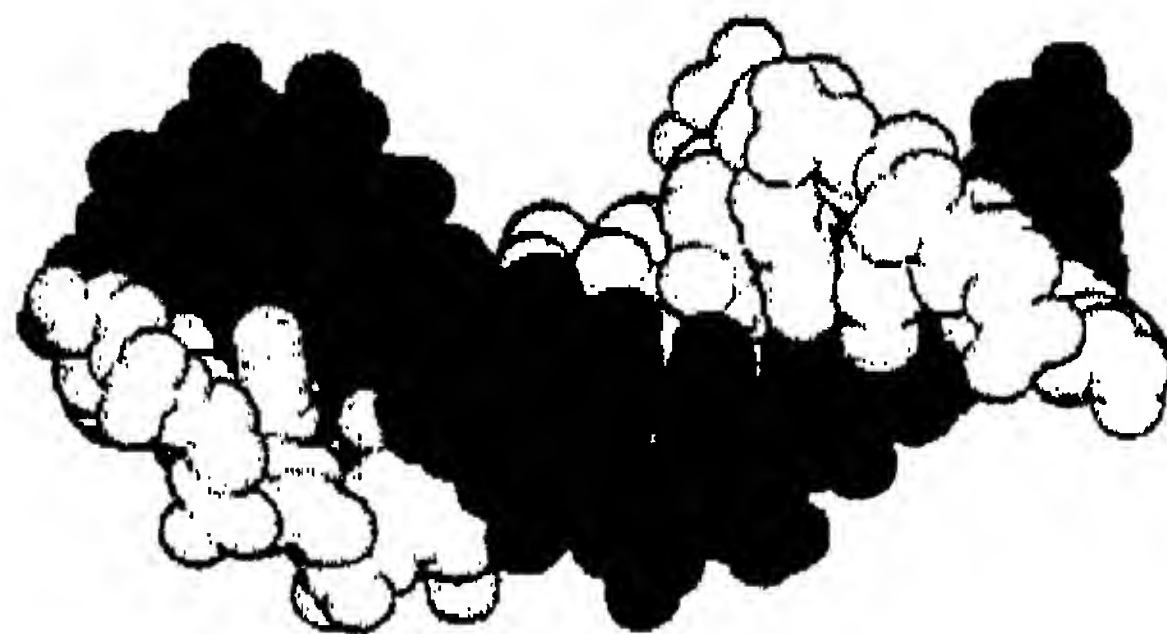
Publisher, CORONA PUBLISHING CO., LTD.

バイオテクノロジー教科書シリーズ

8

酵素工学概論

工学博士 田中 渥夫 共著
工学博士 松野 隆一



biotechnology

コロナ社

担体は、機械的強度が大きく、使用条件下において物理的・化学的・生物学的に安定であることが必要である。特に固定化生体触媒を食品工業や医薬品工業に使用する場合は、人体にとって無害であることが必須の条件となる。

型体の化学構造は、生体触媒を固定化するのに必要な官能基をもつか、あるいはそのような官能基を導入できるものでなければならぬ。また、固定化生体触媒はリアクターの設計にあわせて種々の形で用いられるので、加工成型が容易であることも必要である。また、経済性を考慮することも重要である。現在までに、有機化合物、無機化合物を問わず、多種多様な担体の使用例が報告されているが、代表的なものを表4.1にまとめておく。

固定化法としては

- 1) 共有結合、イオン結合、物理的吸着、生化学的親和力などにより、担体に固定化する担体結合法、
- 2) 生体触媒どうしをグルタルアルデヒドのような二官能性あるいは多官能性試薬で架橋して不溶化する架橋法、
- 3) 低分子化合物を重合あるいは会合させるか、高分子化合物を可溶の状態から不溶の状態に移すことによって生ずる高分子ゲル（格子型）、マイクロカプセル、リポソーム、ミセルなどに生体触媒を包み込んだり、中空繊維（ホロファイバー）や限外ろ過膜に生体触媒を閉じ込める包括法、

がある（図4.1）。

2)の架橋法は厳密な意味での固定化ではないことから、いずれの方法で固定化した酵素も不溶化酵素と呼ばれることもある。

これらの固定化法はいずれも長所と短所を併せもっているが（表4.2）、包括固定化法はすべての生体触媒の固定化に応用しうる汎用性のある方法であることから、工業的なプロセスで使用されることが多い。

このような固定化法に使用される担体は、表4.1に示したように、多量類やタンパク質などの天然高分子、種々の合成高分子、ガラスやセラミックス、金属酸化物のような無機物質、脂質や界面活性剤などの低分子化合物など多岐にわたる。使用される形状も、粒状、ブロック状、フィルム状、シート状、布

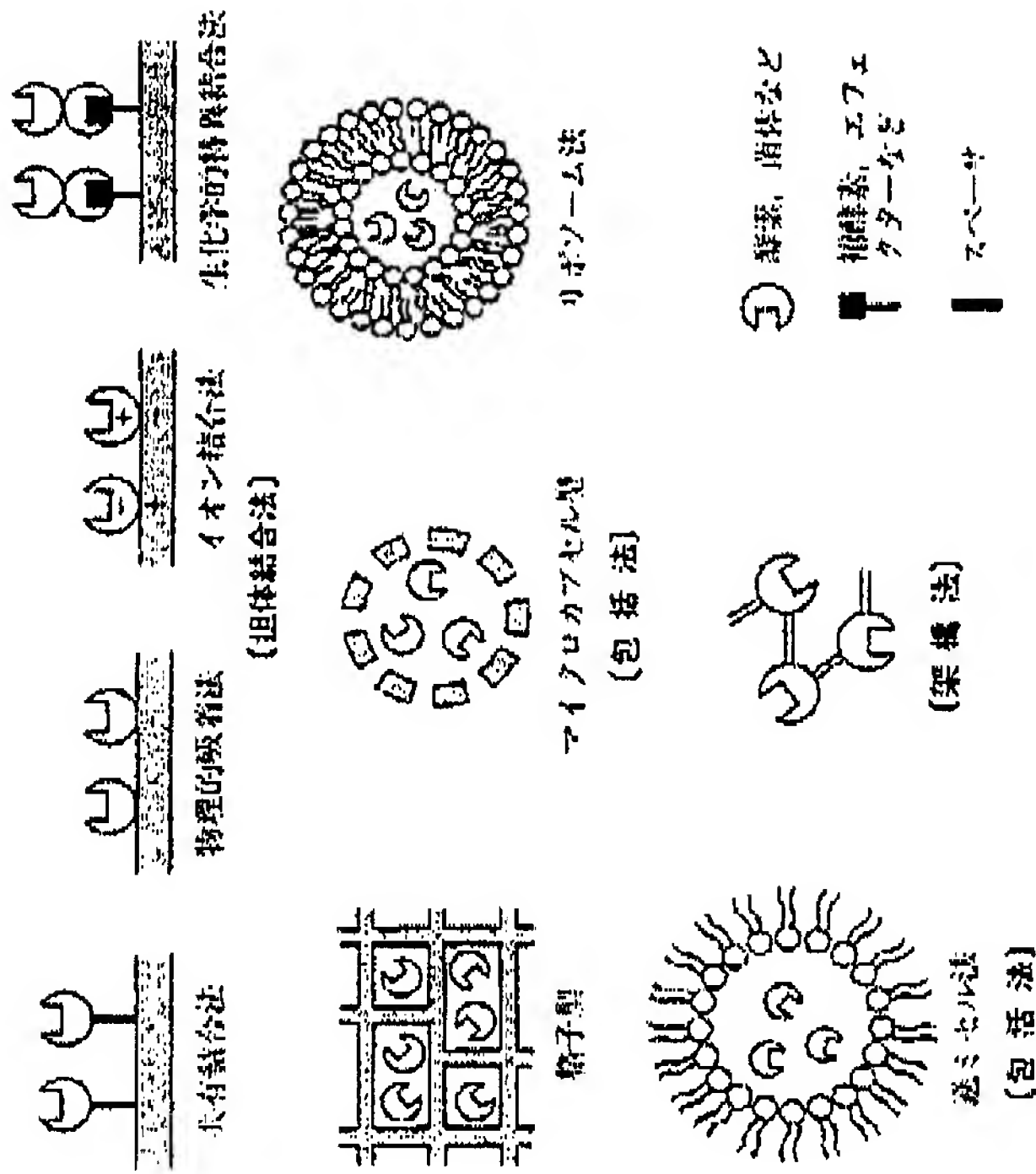


図4.1 種々の生体触媒固定化法

表4.2 生体触媒固定化法の長所と短所

性質	固定化法					包括法	
	共有結合法	物理的吸着法	イオン結合法	架橋法	格子型	マイクロカプセル	リポソーム
剥製の容易性	難	易	易	難	易	難	難
剥製の後の失活の可能性	大	小	小	大	小	大	小
結合の再生力	強	弱	弱	強	強	強	中間
担体の再使用可能性	不可	可	可	可	不可	不可	不可
固定化対象の範囲	狭～中間	中間	中間	中間	広	広	広
異変性の低減	高	低	低	低	中間	中間	中間

（加井三郎（編著）：生体触媒としての微生物，p.101，共立出版（1979）（千畑一郎：基礎酵素工芸講習会，応用酵素学，p.23，表1（1978）を改変した））
・ ジスルフィド結合の場合は可

状、繊維状などさまざまである。

以下に代表的な固定化法のいくつかを紹介するが、実験例についてはほかの成書を参考にされたい^{1)~4)}。

4.2.1 担体結合法

タンパク質である酵素は、反応性のある官能基をもつアミノ酸残基やイオン性のアミノ酸残基、さらに疎水性を示す領域を含んでいる。これらのうち、活性発現にあまり影響を及ぼさないものを選んで、不溶性の担体に共有結合、イオン結合、疎水結合、生化学的特異結合などを介して酵素を固定化するのが担体結合法である。さまざまな担体が用いられてきているが、これらの担体をそのまま、あるいは適当な方法で活性化したのち、固定化に使用する。

(1) 共有結合法

酵素タンパク質には、触媒中心や基質結合部位など活性発現に必要な部位以外にも、リジンのε-アミノ基、システインのスルフヒドリル基、アスパラギン酸のβ-カルボキシル基、グルタミン酸のγ-カルボキシル基、チロシンのフェノール性水酸基、セリンやトレオニンの水酸基、アルギニンのグアニジル基、ヒスチジンのイミダゾリル基、トリプトファンのインドリル基、メチオニンのメチルメルカプト基など、反応性を示す残基が存在し(図4.2)、特に水

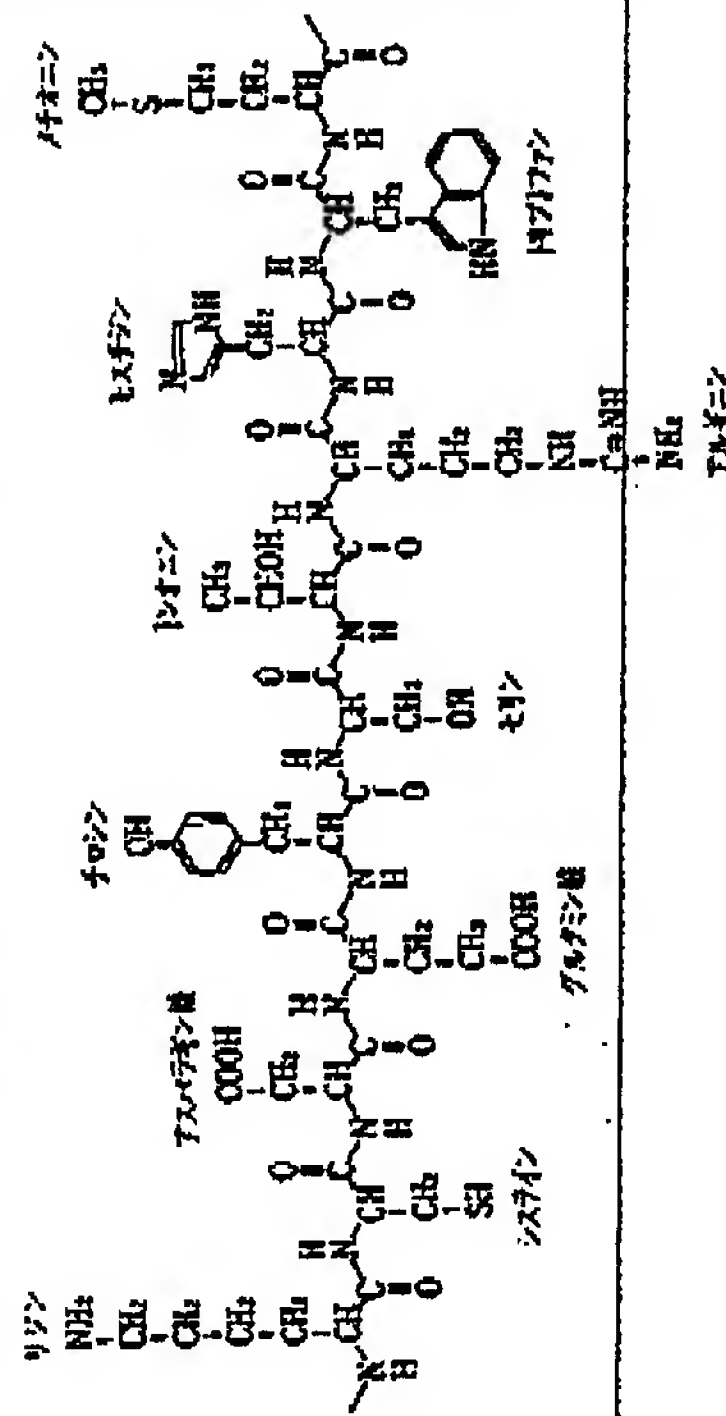


図4.2 固定化に利用しうる側鎖をもつアミノ酸

酸基、カルボキシル基、アミノ基の数は多い。

これらのアミノ酸残基を介して化学的に担体と結合させる共有結合法は

1) 担体と酵素との結合が強固であるため、酵素反応中に担体から酵素が離脱しにくいこと、

2) 酵素が担体の表面近くに存在するため、基質との接触が容易であること、

3) 酵素と担体との結合が強いため、酵素の失活をもたすタンパク質の構造変化をある程度制限することができ、このため、熱や有機溶媒などに対する安定性が増す場合もあること、

などの長所をもつ。一方、短所としては

1) 優れた活性と安定性を与える、最適の担体活性化条件や固定化条件を見つけないのが困難なこと、

2) 酵素が部分的な修飾を受けることにより、タンパク質の立体構造が変化したり、活性中心が一部破壊されたりする恐れがあること、

3) 酵素と担体との強固な結合のため酵素の自由な動きやゆらぎが制限されることにより、基質との相互作用が起こりにくくなる結果、活性の低下が見られること、

4) 微生物菌体や動物細胞の固定化にはあまり適していないこと、

5) 特殊な例(例えば、ジスルフィド結合を介した固定化)を除いて、活性を失った固定化物からの担体の再生が不可能であること、

などである。共有結合法は、工業的な生体触媒の固定化法としてはほとんど使われていないようであるが、分析用の固定化酵素の調製にはよく用いられており、最初に報告されたジアゾ化ポリアミノスチレン樹脂への固定化以来、種々の原理に基づいた方法が報告されている。ここではそれらのうち代表的なものをいくつか紹介する。

(a) 異化シアン活性化法 デキストラン (Sephadex など)、アガロース (Sephacrose など)、セルロースなどの多糖類や多孔性ガラスビーズなどは固定化用担体としてよく用いられている。しかしながら、これらの担体はその

—著者略歴—

田中 温夫

1962年 京都大学工学部工業化学科卒業
 1967年 京都大学大学院博士課程修了（工学研究科工業化学専攻）
 1968年 京都大学助手（工学部）
 1969年 工学博士（京都大学）
 1981年 京都大学講師（工学部）
 1984年 京都大学助教授（工学部）
 1986年 京都大学教授（工学部工業化学科）
 1993年 改組により京都大学大学院教授（工学研究科合成・生物化学専攻）
 現在に至る

松野 隆一

1962年 京都大学工学部化学機械学科卒業
 1967年 京都大学大学院博士課程修了（工学研究科化学機械学専攻）
 1967年 京都大学助手（工学部）
 1968年 工学博士（京都大学）
 1968年 岡山大学助教授（工学部）
 1970年 京都大学助教授（農学部）
 1984年 京都大学教授（農学部食品工学科）
 現在に至る

酵素工学概論

Outline of Enzyme Engineering

© Tanaka and Matsuno 1995

1995年10月30日 初版第1刷発行

後印省略

著 者 田 中 温 夫

京都府相楽郡本庄町宛台7-9-7

松 野 隆 一

長岡京市河陽が丘2-13-2

発 行 者 株式会社 コ ロ ナ 社

代 表 者 牛 来 辰 巳

印 刷 所 新日本印刷株式会社

112 東京都文京区千石 4-46-10

発行所 株式会社 コ ロ ナ 社

CORONA PUBLISHING CO., LTD.

Tokyo Japan

振替 00140-8-14844・電話 (03) 3941-3131 (代)

ISBN 4-339-06708-3

(製本：愛千製本所)

Printed in Japan



無断複写・転載を禁ずる

希丁・乱丁本はお取替いたします